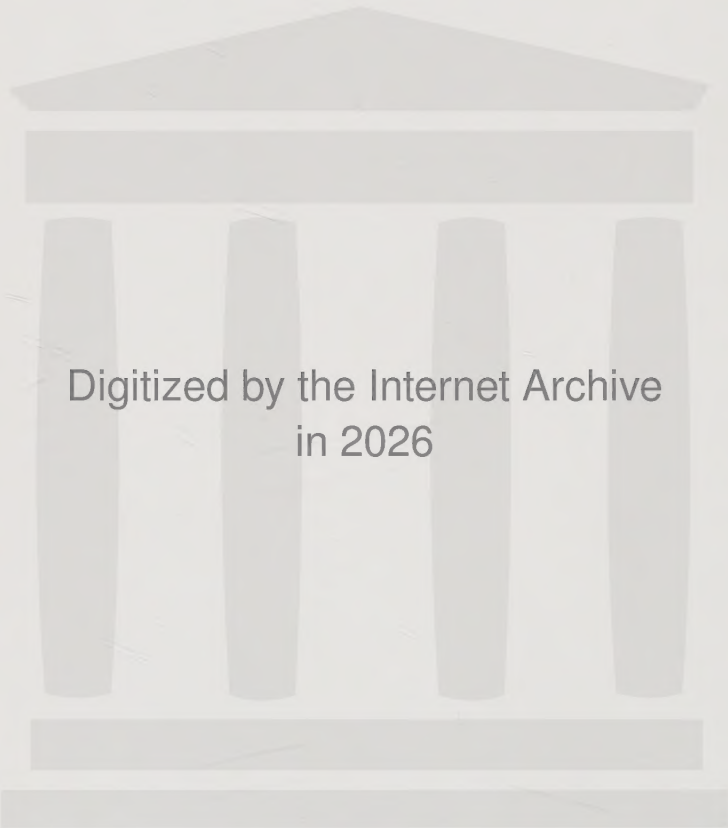


Histochemische Untersuchungen über das Verteilungs-
muster und circadiane Verhalten von Darmschleim-
hautenzymen erwachsener männlicher Ratten

Gerd Allbach

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554425_0043

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Professor Dr. H. Bredt)

Histochemische Untersuchungen über das Verteilungs-
muster und circadiane Verhalten von Darmschleim-
hautenzymen erwachsener männlicher Ratten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Gerd Allbach
aus Lamsheim
Mainz 1972

Dekan: Professor Dr.A.Mayet

Referent: Professor Dr.H.Bredt

Tag der mündl.

Prüfung: 14.7.72



INHALT

Einleitung

Die Bedeutung der Kunst im Leben

von Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Die Kunst als Lebensform

von Dr. phil. Dr. phil. Dr. phil.

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform

Meiner Frau

Meiner Frau

Die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform, die Kunst als Lebensform

Die Kunst als Lebensform

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>I. Einleitung</u>	1
<u>II. Kurze Typisierung der untersuchten Enzyme im Stoffwechsel</u>	4
<u>III. Material und Methode</u>	6
Histochemische Methoden	7
Methode der Histochemischen Auswertung	10
Methode der statistischen Auswertung	11
<u>IV. Ergebnisse bisheriger Untersuchungen</u>	12
<u>V. Eigene Ergebnisse</u>	18
Morphologische Befunde	18
Statistische Auswertung	27
<u>VI. Diskussion</u>	37
Diskussion zur histotopochemischen Verteilung der dargestellten Enzyme	38
Diskussion zu den tagesrhythmisch bedingten Schwankungen	41
<u>VII. Zusammenfassung</u>	47
<u>VIII. Literaturverzeichnis</u>	49
<u>Lebenslauf</u>	
<u>Anhang-Tabellen zur statistischen Auswertung</u>	

I. EINLEITUNG

Seit der Erkenntnis Forsgrens (16), daß der Glykogengehalt der Leber tagesperiodischen Schwankungen unterworfen ist, wurde in zahlreichen Untersuchungen eine solche Tagesperiodik nicht nur für verhaltensbiologische Funktionen, sondern auch für eine große Zahl von Stoffwechselfunktionen nachgewiesen, so daß bei Pflanzen, Tieren und Menschen an mehr als 100 verschiedenartigen physiologischen Größen und an über 50 Organen tagesrhythmische Schwankungen festgestellt werden konnten (Zusammenfassende Literatur: Bünning 6; v. Mayersbach 41; Wohlrab 66). Diese 24-Stunden-Periodik beruht bei Tier und Mensch auf einer angeborenen endogenen Komponente, während Umweltseinflüsse physikalischer, chemischer und soziologischer Art (Hell-Dunkel, Temperatur, Geruchsreize, Lärm u.s.w.) nur als sogenannte Zeitgeber wirken und die Phasenlage der Periodik bestimmen (Aschoff 1). Besonders durch den Arbeitskreis um v. Mayersbach wurde gezeigt, daß die biologischen Tagesschwankungen von großem Einfluß auf den Reaktionsausfall fermenthistochemischer Untersuchungen sind. Derartige tageszeitlich bedingten Unterschiede im Reaktionsausfall der SDH, sowie der unspezifischen Esterase betrafen in der Rattenleber nicht nur die Aktivitätshöhe, sondern auch die topochemische Verteilung der Enzyme (Jerusalem und Mitarb. 28; v. Mayersbach 42; v. Mayersbach und Mitarb. 44; v. Mayersbach und Yap 46; Yap 70). Auch mit biochemischen Methoden konnten an der Rattenleber tagesperiodische Schwankungen von Enzymen festgestellt werden (Civen und Mitarb. 8; Frajola 17; Fuller und Snody 19; Holmgren und Svanborg 26; Wurtmann 68).

Die mit histochemischen und lichtmikroskopischen Methoden erhobenen Befunde biorhythmischer Veränderungen der Leberepithelzellen (v.Mayersbach und Leske 43) konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen untermauert werden (Müller und Mitarb. 47). Bei einem Vergleich histochemischer und elektronenmikroskopischer Veränderungen der Leberzelle im Tagesrhythmus und unter experimentellen Bedingungen konnten Jerusalem und Mitarbeiter (28) feststellen, daß das Ausmaß der tagesrhythmischen Schwankungen so erheblich sein kann, daß es die durch Experimente hervorgerufenen Veränderungen übertrifft.

Untersuchungen dieser Art am Darm liegen nicht vor, obgleich der Dünndarm als eines der stoffwechsel- und fermentaktivsten Organe gelten kann und der für zahlreiche Tiere bekannte tagesrhythmische Wechsel der Freßaktivität auf periodische Unterschiede der Funktionslage des Magen-Darmtraktes hinweist.

Auf Grund der immer wieder verfeinerten Methoden zur histochemischen Darstellung von Enzymen ist es möglich von der Farbintensität auf die Enzymaktivität Rückschlüsse zu ziehen. Der Untersuchende muß sich darüber im Klaren sein, daß diese semiquantitative Methode nur im Vergleich unterschiedliche Aktivitäten erkennen läßt (Rassner 54; Zimmermann 71). Es ist dabei nicht möglich absolute Wertungen anzugeben, womit auch ein Vergleich zwischen zwei Enzymfärbungen unmöglich wird. Trotzdem zeigt die histochemische Methode mehrere Vorteile gegenüber der biochemischen Messung. Es wird möglich ein Enzym im histologischen Schnitt "in loco" darzustellen. Ein weiterer Vor-

zug besteht in der Möglichkeit das Darmmaterial mehrerer Tiere unter gleichen Bedingungen zu verarbeiten.

Wie Nakamura und Mitarbeiter (51) an der SDH zeigt, können durch das Homogenisieren von Gewebe inhibitorische Substanzen mit den Enzymen zusammenkommen, in diesem Falle gesättigte Fettsäuren, die die SDH hemmen, dadurch können sich auch biochemisch ungenaue Aktivitäten ergeben.

Es ist die Aufgabe dieser Arbeit, histochemisch das Enzymmuster des Rattendarms für folgende Fermente zu untersuchen und qualitative und quantitative Unterschiede des histochemischen Reaktionsausfalls in verschiedenen Darmabschnitten und zu verschiedenen Tageszeiten aufzuzeigen:

1. LAP - Leucinaminopeptidase
2. SDH - Succinodehydrogenase
3. LDH - Laktatdehydrogenase
4. G6PDH- Glukose-6-phosphatdehydrogenase
5. MAO - Monoamino-oxidase

II. KURZE TYPISIERUNG DER UNTERSUCHTEN ENZYME IM STOFFWECHSEL

LAP: Das Enzym gehört zur Gruppe der Hydrolasen und ist im Mikrovillisaum der Enterozyten nachgewiesen worden. Es wird übereinstimmend von mehreren Autoren als Membranenzym beschrieben (Dawson und Prys-Davies 11; Frič und Lojda 18; Shnitka 58; Vollrath 64). Seine Substrate sind Leucil-(Methoxy)-beta-naphthylamide, kleine Peptide mit endständiger Säuregruppe. Die Bürstensaum-aminopeptidase katalysiert die Hydrolase und Verdauung dieser Peptide (Lojda und Mitarb. 39).

SDH: Dieses Flavoproteid katalysiert im Krebszyklus die Oxydation der Bernsteinsäure zu Fumarsäure, wobei zwei Wasserstoffatome direkt auf die Atmungskette übertragen werden. Das Enzym bildet dadurch die wichtige Brücke zwischen dem letzten Schritt des Kohlehydratabbaus und der Atmungskette. Die SDH-Aktivität ist somit ein limitierender Parameter zur ATP-Synthese der Zelle (Karlson 31).

LDH: Das Enzym katalysiert den letzten Schritt in der anaeroben Glykolyse. Es reduziert Pyruvat zu Laktat durch Oxydation des Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+). Damit steht das Pyridinnucleotid zur Katalyse der Triosedehydrierung wieder zur Verfügung. Die LDH-Aktivität ist so ein direkter Parameter, die anaerobe Glykolyse zu beurteilen (Himmelhoch 25; Karlson 31).

G6PDH: Das Enzym oxydiert Glucose-6-Phosphat am C₁-Atom durch Übertragung zweier H⁺-Atome auf NADP⁺ unter Bildung von 6-Phosphogluconsäure. Auf diesem Wege können aus Glucose Pentosen entstehen. Die G6PDH-Aktivität weist auf die Bildung von NADPH⁺ und H⁺ hin, das bei Synthesereaktionen z.B. im Fettstoffwechsel unentbehrlich ist, und auf die Pentosebildung, die im Nucleinsäurestoffwechsel gebraucht wird (Karlson 31).

MAO: Das Enzym scheint außer in den Mitochondrien auch im Bürstensaum der Enterocyten vorzukommen. Erklärt wird die Lokalisation mit einer Entgiftungsfunktion für biogene Amine im Darm (Davison 10; Eder 12; Iwai 27; Shnitka 58; Tuba 61). Lojda und Mitarbeiter (39) kommen zum gleichen Ergebnis, da sie in den Enterocyten eine viel höhere Aktivität finden, als in den Hepatocyten.

III. MATERIAL UND METHODE

Die Untersuchungen wurden an 42 männlichen Ratten eines Sprague-Dawley-Stammes (Zucht des Pathologischen Instituts der Universität in Mainz) durchgeführt. Die Tiere wogen zwischen 240 und 270 Gramm und hatten ein Alter von 4-4 1/2 Monate. Alle Tiere wurden unter gleichen Bedingungen im gleichen Raum gehalten, in dem sie bereits geboren und aufgewachsen waren und in dem sie von äußeren Störfaktoren möglichst abgeschirmt waren. Futter (Altromin R 10 Mischfutter) und Trinkwasser ad libitum. Beleuchtung: Normales Tageslicht. Alle Versuche wurden im August 1970 durchgeführt. Die Darmstücke wurden in Äthernarkose immer von der gleichen Person an folgenden Stellen entnommen. Duodenum 1cm caudal vom Pylorus, proximales Jejunum knapp hinter der Flexura duodenojejunalis. Der herauspräparierte Restdarm wurde gedrittelt, wobei das Ende des proximalen Drittels dem caudalen Jejunum, das Ende des mittleren Drittels dem proximalen Ileum entspricht. Das caudale Ileum wurde 1cm vor der Bauhinschen Klappe entnommen. Das Colon entstammt der Mitte des Colon transversum.

Alle Darmabschnitte eines Tieres wurden sofort nach Antnahme mit Kohlesäureschnee auf einen Kryostat-Tisch aufgefroren und im Gerät (System Dittes-Duspiva) geschnitten (Schnitt-dicke 16µ). Die Schnittrichtung erfolgte senkrecht zu den Darmlumen, sodaß jedes Präparat alle Darmabschnitte enthielt und somit in der weiteren Verarbeitung gleichen Bedingungen unterworfen werden konnte.

Die 42 Tiere wurden in 6 Gruppen zu jeweils 7 Tieren eingeteilt. Jeder Tiergruppe wurde der Darm zu einer anderen Tageszeit entnommen: 1. Gruppe 20Uhr; 2. Gruppe 24Uhr; 3. Gruppe 4Uhr
4. Gruppe 8Uhr; 5. Gruppe 12Uhr; 6. Gruppe 16Uhr

HISTOCHEMISCHE METHODEN

Leucin-aminopeptidase

Methode nach Nachlas, Crawford und Seligman (49)

Inkubation: 90 Min. bei 37 Grad C

Inkubationslösung: 8mg Leucin-b-naphthylamid HCl.....1ml
 Acetatpuffer...pH 6,5.....10ml
 0,85% NaCl.....8ml
 0,02m KCN.....1ml
 Echtblausalz B.....10mg

pH 6,5 20ml

Nachbehandlung:

2Min. mit physiologischer Kochsalzlösung spülen

2Min. in 0,1m Kupfersulfatlösung spülen

1Min. mit physiologischer Kochsalzlösung nachspülen

Eindecken mit Kaisers Glycerin-Gelatine

Succino-dehydrogenase

Methode nach Nachlas und Mitarb. (48)

Inkubation: 2Std. bei 37 Grad C

Inkubationslösung: filtrieren und auf 37°C erwärmen

0,2m Na-Succinat.....10ml
 0,2m Phosphatpuffer...pH 7,6.....10ml
 Nitro Blue Tetrazolium
 10mg ad 10ml H₂O.....10ml
 Ca-Chlorid 0,03m.....0,2ml
 Al-Chlorid 0,01m.....0,8ml
 Na-HCO₃ 0,6 m.....2,0ml

pH 7,6 33,0ml

Spülen in aqua dest; Fixierung : 24Std. in 4% neutr. Formol

5Min. 15% Alkohol, spülen in Wasser, eindecken mit Kaisers Glycerin-Gelatine

Lactat-dehydrogenase

Methode nach Nachlas, Walker und Seligman (50)

Inkubation: 90 Min. bei 25 Grad C

Inkubationslösung: DPN... 25mg/5ml H₂O..... 1,5ml
Nitro BT.. 25mg/5ml H₂O..... 1,5ml
Phosphatpuffer... pH 7,4..... 5,0ml
0,5m Natrium Lactat..... 3,0ml
Aqua bidest..... 4,0ml

pH 7,4 15,0ml

1 Min. in 1% HCl spülen; Fixierung: 24 Std. in 4% neutr. Formol,
abspülen in aqua dest, eindecken mit Kaisers Glycerin-Gelatine.

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Methode nach Rudolph und Klein (57)

Inkubation: 45 Min. bei 37 Grad C

Inkubationslösung: filtrieren und auf 37°C erwärmen
Di-Na-Glucose-6-Phosphat..... 10,0mg
TPN (Natriumsalz)..... 12,5mg
0,2m Tris-Puffer.. pH 7,2..... 10,0ml
1% Nitro Blue Tetrazolium..... 5,0ml
Aqua dest..... 10,0ml

pH 7,2 30,0ml

Fixierung: 24 Std. in 4% neutralem Formol, spülen in aqua dest
und eindecken mit Kaisers Glycerin-Gelatine

Monoamino-dehydrogenase

Methode nach Glenner, Burtner und Brown (20)

Inkubation: 2-3 Std. bei 37 Grad C

Inkubationslösung: filtrieren und auf 37°C erwärmen
Trypaminhydrochlorid.....75,omg
Na-Sulfat..12omg/5oml H₂O..... 5,oml
Nitro Blue Tetrazolium.....15,omg
0,1m Phosphatpuffer..pH 7,6.....15,oml
Aqua dest.....30,oml

pH 7,6 65,oml

Nachbehandlung: 2Min.spülen in fließendem Wasser; Fixierung:
24Std. in 4% neutralem Formol, spülen in aqua dest, eindecken
mit Kaisers Glycerin-Gelatine.

METHODE DER HISTOCHEMISCHEN AUSWERTUNG

Bei allen Methoden wurden Kontrollschnitte ohne Substrat inkubiert, die dazu dienten, unspezifische Grundfärbungen von Substratspezifischen Niederschlägen zu unterscheiden. Zimmerman(71) gibt Maßstäbe zur quantitativen Auswertung der Enzymaktivitäten an. Bretfeld (3) machte damit gute Erfahrungen bei der histochemischen Auswertung von Mamapräparaten. Um die histochemischen Reaktionsausfälle einer statistischen Auswertung zuführen zu können, wurde an Stelle der üblichen histochemischen Auswertung (0-3+) eine Zahlenskala von 1-8 gewählt. Pro Tier, Zeiteinheit und Darmabschnitt gelangten 5-7 Präparate zur Auswertung, wobei die unterschiedliche Präparatezahl durch z.T. schadhafte und nicht auswertbare Schnitte bedingt ist.

- 0 = 1: Leerwert = keine spezifische Anfärbung
- (+) = 2: nicht eindeutig spezifisch gefärbt
- + = 3: schwach, aber deutlich gefärbt
- +--+ = 4: schwach bis mittelstark positiv gefärbt
- ++ = 5: mittelstark positiv gefärbt
- ++-+++ = 6: mittelstark bis stark positiv gefärbt
- +++ = 7: stark positiv gefärbt
- ++++ = 8: sehr stark gefärbt

Zu Beginn jeder quantitativen Enzymauswertung wurden sieben Präparate und ein Leerwert herausgesucht, die den einzelnen Bewertungsstufen deutlich zugeordnet werden konnten. Diese wurden im weiteren Verlauf der Auswertung unter dem Mikroskop als Vergleichspräparate mitgeführt. Dem Auswertenden wurden die Schnitte in unbekannter Reihenfolge und ohne Signatur gereicht, um eine Beeinflussung auszuschalten.

METHODE DER STATISTISCHEN AUSWERTUNG

Nach der visuellen mikroskopischen Auswertung der histochemischen Präparate übertrug ich die Bewertungsstufen auf Lochkarten. Mit Hilfe der einfachen Datenverarbeitung wurde für jedes Enzym pro Darmabschnitt und Zeitpunkt die Anzahl der ausgewerteten Schnitte (n), der Mittelwert ($\bar{x}$), die Standardabweichung (s) und die Varianz (s^2) errechnet. Beispiel: (Tab. 6 Anhang) LAP, Duodenum, 20Uhr, $n=32$, $\bar{x}=4,5$, $s^2=0,63$, $s=0,79$; d.h.: für die LAP wurden vom Duodenum um 20Uhr $n=32$ Schnitte ausgewertet, mit dem Mittelwert $\bar{x}=4,5$; der Standardabweichung $s=0,75$ und der Varianz $s^2=0,63$.

Die Mittelwerte zeigten zum Teil erhebliche Unterschiede. Zur Signifikanzprüfung wurde die Varianzanalyse herangezogen (Champell 7; Koller 33). Sie gestattet nur eine pauschale Aussage, ob zwischen den geprüften Mittelwerten ein mehr als zufälliger Unterschied besteht, aber nicht zwischen welchen diese Differenz ist. Um bei der Tagesrhythmik und darmabwärts genau aussagen zu können, zwischen welchen Zeitpunkten und Darmsegmenten signifikante Unterschiede bestehen, war es nötig Kontraste zu bilden.

Mit Hilfe des Scheffé-Testes kann man nun feststellen, welche Kontraste, bzw. Mittelwertgruppen signifikante Unterschiede ergeben (Koller 33). Die Ergebnisse sind in Tabellen zusammengefaßt. Zur besseren Übersicht sind in den Tabellen nur signifikante Differenzen angegeben:

++ : signifikant = 1% > Überschreitungswahrscheinlichkeit
 + : auffällig = 5% >

IV. ERGEBNISSE BISHERIGER UNTERSUCHUNGEN

Der Magen-Darmtrakt von Mensch und Tier, der durch Resorption und Sekretion zu den stoffwechselaktivsten Organen des Organismus gehört, bietet sich zu Enzymuntersuchungen im weitesten Sinne an. Da die Aktivität und Stoffwechselfunktion eines Zellorganells, einer Zelle und eines Organs direkt durch die vorhandenen Enzyme und deren Quantität festgelegt ist, ging das Bestreben dahin, die Fermente quantitativ und qualitativ zu erforschen. Seit es Gomory (22) gelang die Alkalische Phosphatase im histologischen Schnitt darzustellen, vergingen noch ca. 20 Jahre bis zur Entwicklung weiterer brauchbarer histochemischer Methoden. Erst in den letzten zehn Jahren wurden von mehreren Autoren Enzymverteilungen in Organen und Organteilen z.B. des Gastrointestinaltraktes mit seinen anatomisch festgelegten Unterabschnitten erfaßt (Dawson und Pryse-Davies 11; Frič und Lojda 18; Himmelhoch 25; Jervis 29; Jwai 27; Jos und Mitarb. 30; Klein und Mitarb. 32; Kubat und Koldovsky 34; Noak und Mitarb. 52; Vollrath 64). Zur Frage der cytotopohistochemischen Lokalisation von Darmenzymen haben Iwai (27) und Lojda und Mitarbeiter (39) umfassende Studien veröffentlicht.

Nach Dawson und Pryse-Davies (11) handelt es sich bei der LAP um ein Desmoenzym, das im Mikrovillisaum der Enterocyten nachgewiesen werden kann. Die Aktivität der LAP ist auf das Dünndarmzottenepithel beschränkt, dabei scheint das mittlere Zottendrittel gegenüber Zottenbasis und Spitze eine etwas höhere Färbung zu besitzen (Dawson und Pryse-Davies 11). Jos und Mitarbeiter (30) beschreiben die Anfärbung in den

Lieberküh'schen Krypten als sehr schwach bis negativ. Am Übergang von Krypte zu Zotte zeigt sich in den Enterocyten ein rapider Aktivitätsanstieg. Auf Grund von Untersuchungen ist bekannt, daß das Darmepithel aus den Krypten heraus regeneriert, während Enterocyten an der Zottenspitze in den Chymus abgegeben werden (Bertalanffy 2). Der Aktivitätsanstieg ist daher als Ergebnis einer intrazellulären Ausdifferenzierung der Zellorganellen und des Enzymgehalts anzusehen (Klein und Mitarb. 32; Pearse und Riecken 53). Weiterhin zeigt es sich, daß durch Parallelität des enzymhistochemischen Niederschlags und der Enzymaktivität, Darmabschnitte auf ihre Verdauungsfunktion festgelegt werden können. Zum Beispiel beschreiben Frič und Lojda (18) eine LAP-Abnahme im Jejunum bei Patienten mit primärem Malabsorptionssyndrom. Von allen Autoren wird übereinstimmend das Fehlen von LAP in der Magenschleimhaut bei Ratte und Mensch bestätigt (Klein und Mitarb. 32; Pearse und Riecken 53; Shnitka 58). Das Colon der Ratte ist negativ, während im menschlichen Colonepithel Aktivitätsflecken von Iwai (27) und Shnitka (58) beschrieben werden.

Die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen aus der Literatur sind in Tabelle 1 S. 15 zusammengefasst.

Die intracelluläre Verteilung der vier Dehydrogenasen: SDH, LDH, G6PDH und MAO ähnelt sich sehr stark. Das Verteilungsmuster der Aktivitäten in den einzelnen Darmabschnitten ist jedoch unterschiedlich. Alle genannten Enzyme zeigen eine typische Dreistreifung des Epithels. Die supra- und infranucleären Aktivitätsstreifen werden durch einen negativen

hellen Streifen getrennt, der durch die ungefärbten Kerne zustande kommt (Iwai 27; Lojda und Mitarb. 39; Vollrath 64). Lojda und Mitarbeiter (39) beschreiben in apikalen Zellteilen des menschlichen Jejunums eine höhere Aktivität, die durch erhöhte Energieleistung während der Resorption erklärt wird. Vollrath (64) findet dagegen bei den Ratten basal und apikal bei SDH und LDH etwa gleich starke Aktivitäten, gelegentlich auch basal stärker. Übereinstimmend werden in der Literatur die drei Enzyme SDH, LDH und G6PDH in den Mitochondrien lokalisiert (Dawson und Pryse-Davies 11; Iwai 27; Klein und Mitarb. 32; Lojda und Mitarb. 39; Pearse und Riecken 53; Shnitka 58). Die MAO scheint außer in den Mitochondrien auch im Bürstensaum der Enterocyten vorzukommen (Iwai 27). Zusammenfassende Übersicht der Literatur über Dehydrogenasen
Tabelle 2-5 (S. 15/16/17)

ENZYMVERTEILUNG IN DÜNNDARM UND COLON; BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN

<u>Tab.1 LAP</u>	Duodenum		Jejunum		Ileum		Colon	
<u>Ratte</u>	Zotte	Krypte	Zotte	Krypte	Zotte	Krypte	Oberfl.	Kryp.
Iwai (27)	2-1+	0	2+	0	2+	0	0	0
Vollrath(64)			3+	2+				
<u>Mensch</u>								
Iwai (27)	2+	+0	2+	+0	2+	+0	0-/+	0
Klein und Mitarb.(32)	3+	0	3+	0			0	0
Dawson und Pryse-								
Davies (11)	2+	2+	2+	2+	2+		0	0
Shnitka(58)							0-1+	
Frič und Lojda (18)			3+	0				
<u>Meerschweinchen</u>								
Iwai (27)	2+	0	2+	0	2+	0	0	0
<u>Maus</u>								
Iwai (27)	2+	0	3-2+	+0	3-2+	+0	0	0

Tab.2 SDH

<u>Ratte</u>								
Iwai (27)	2+	2-1+	2+	2-1+	2+	+	2-1+	+
Kubat und Kol-								
dowsky (34)			3+	+	3+	+	3+	+
Shnitka(58)	3+		2+	+	2+	+	3+	
Vollrath(64)			3+	+				
<u>Mensch</u>								
Iwai (27)	2+	2-1+	2+	2-1+	2-1+	+	+	+0
Dawson und Pryse-								
Davies (11)			2+	2+	2+	3+	2+	2+
Klein und Mitarb.(32)	2+	+	2+	+	+		2+	2+
Lojda und Mitarb.(39)			3+	+				
Frič und Lojda (18)			2+	+				
<u>Maus</u>								
Iwai (27)	2+	2-1+	2+	+	2+	2-1+	2+	+

<u>Tab.3 LDH</u>	Duodenum		Jejunum		Ileum		Colon	
<u>Ratte</u>	Zotte Krypte		Zotte Krypte		Zotte Krypte		Oberfl. Krypt.	
Iwai(27)	2+	+	2+	+	2+	+	2+	2-1+
Kubat und Koldowsky(34)			3+	+	3+	+	2-3+	+
Vollrath(64)			3+	+				
<u>Mensch</u>								
Dawson und Pryse-								
Davies(11)			3+	2+	3+	2+	3+	2+
Klein und								
Mitarb.(32)	3+	2+	3+	2+	3+		2+	2+
Iwai(27)	2+	+	2+	+	2-1+	+	+	+ - 0
Lojda und								
Mitarb.(32)			3+	+				
Frič und								
Lojda(18)			3+	+				
<u>Meerschweinchen</u>								
Iwai(27)	2+	+	+	+ - 0	+	+ - 0	2+	+ - 0
<u>Maus</u>								
Iwai(27)	2+	2-1+	2+	2-1+	2+	+	2+	+

Tab.4 G-6-PDH

<u>Ratte</u>								
Iwai(27)	2+	0	2+	0	2+	0	2-1+	+
Kubat und Koldowsky(34)			3+	+	3+	+	3+	+
Vollrath(64)			3+	+				
<u>Mensch</u>								
Frič und								
Lojda(18)	2-3+		2-3+					
Iwai(27)	2+	+	2+	+	2+	+	+	+ - 0
Klein und								
Mitarb.(32)	3+	2+						
Lojda und								
Mitarb.(39)			3+	+				
<u>Meerschweinchen</u>								
Iwai(27)	2+	+	2+	0	2+	0	2+	+ - 0
<u>Maus</u>								
Iwai(27)	2+	+	2+	0	2+	0	2+	+ - 0

<u>Tab.5</u> <u>MAO</u>	Duodenum		Jejunum		Ileum		Colon	
<u>Ratte</u>	Zotte	Krypte	Zotte	Krypte	Zotte	Krypte	Oberfl.	Kryp.
Iwai(27)	2+	+	3+	+	3+	+	2+	+
Kubat und								
Koldowsky(34)			3+	+	3+	+	2+	+
Shnitka(58)	2+		2+		2+		+	
Eder(12)	2+	+	2+	+	2+	+	2+	+
<u>Mensch</u>								
Iwai(27)	2+	2-1+	2-3+	2-1+	2+	2-1+	2-1+	+
Jerwis(29)	3+		2+		+			
<u>Meerschweinchen</u>								
Iwai(27)	3-2+	+	3-2+	+	3-2+	+	3-2+	+
<u>Maus</u>								
Iwai(27)	3-2+	+	3+	+	3+	+	3+	3

V.EIGENE ERGEBNISSE

MORPHOLOGISCHE BEFUNDE

Bei der LAP färben sich die Enterocyten der Duodenalzotten im Durchschnitt mittelstark an. Das Zottenstroma zeigt eine leichte diffuspositive Reaktion, die am Kryptenhals plötzlich abbricht. Krypten, Submucosa und Muscularis propria sind im Präparat absolut negativ. Auch die Becherzellen der Mucosa stellen sich als helle Epithelaussparungen dar. Die Verteilung innerhalb einer Zotte läßt sich nur bedingt einer Regel unterwerfen. Die intensive Anfärbung erstreckt sich meist über die beiden kryptennahen Drittel. Zum Kryptenhals hin verliert sich die Aktivität im Epithel rasch (Abb. 1a S. 19). Gelegentlich scheint in den Enterocyten der Zottenspitze die Reaktion etwas schwächer auszufallen als in den beiden unteren Dritteln der Zotte. Man findet eine Reaktion in Form von bläulich-violetten feingranulierten Niederschlägen, die in den Epithelzellen vor allem supranucleär ausgeprägt ist. Die Reaktion ist häufig noch einmal in zwei Streifen unterteilt, von denen sich ein etwas breiterer Streifen unmittelbar über dem Kern befindet und der Golgi-Zone entsprechen dürfte. Der zweite etwas schmalere Streifen ist in der äußersten Zellspitze lokalisiert und entspricht wahrscheinlich dem Bürstensaum. Gelegentlich erkennt man an der lateralen und basalen Zellmembran noch einmal eine schwache streifenförmige Reaktion (Abb. 1b S. 19). Die Anfärbung des Zottenepithels im unteren Jejunum und oberen Ileum unterscheidet sich gegenüber dem Duodenum nicht nur durch Aktivitätssteigerung, sondern auch in der Zottenverteilung. Auffällig ist das Zottenepithel das von Kryptenhals bis zur Spitze gleichmäßig gefärbt ist. Im Duodenum dagegen enthält das mittlere Zotten-

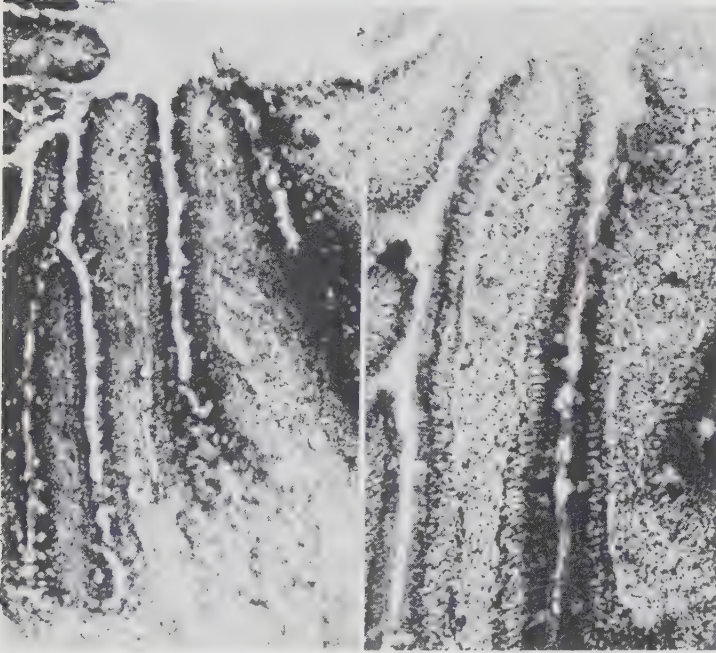


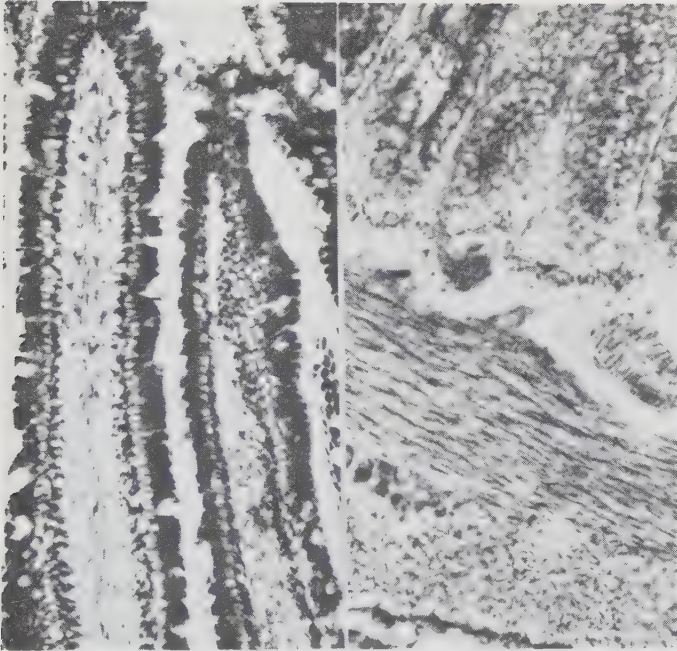
Abb.1a: Histochemische Reaktion der LAP im oberen Jejunum. Die Reaktion bricht an der Zottenbasis ab, die Krypten sind negativ. Vergr.: 100x

b: Histochemische Reaktion im oberen Jejunum der LAP bei stärkerer Vergrößerung. Beachte die Abschwächung der Reaktion an der Zottenspitze und die Topik des Reaktionsausfalles in den Epithelzellen. Vergr.: 200x

drittel oft die etwas höhere Aktivität. Die reichlich eingestreuten Becherzellen sind negativ, das Colon ohne Aktivität. Es kann also festgestellt werden, daß bei der LAP der stärkste Reaktionsausfall im unteren Jejunum und oberen Ileum zu finden ist, d.h. daß die Aktivität dieses Enzyms vom Duodenum bis zum unteren Ileum zunächst ansteigt, bis zur Ileo-coecal-klappe wieder etwas abfällt, um im Colon völlig negativ zu sein.

Zu den verschiedenen Tageszeiten sind im Hinblick auf den qualitativen Reaktionsausfall der LAP, d.h. deren topochemische Verteilung, keine Unterschiede wahrnehmbar, sondern nur im Hinblick auf die Stärke des Reaktionsausfalls, also der histochemischen Aktivität des Enzyms. Auf dieses Phänomen soll hier nur kurz hingewiesen werden, da es vor allem Gegenstand der statistischen Auswertung ist.

Bei der SDH stellt sich das Zottenepithel des Duodenums tiefblau dar. In den Enterocyten zeigt sich apikal und basal je ein Aktivitätsstreifen. Diese besitzen ein Breitenverhältnis apikal zu basal wie 4:1. Der hellere Mittelstreifen wird durch die Anordnung der Enterocytenkerne bedingt. Im Epithelverband sind deutlich paranucleäre Aktivitätsbrücken zu erkennen (Abb. 2a S. 21). Die Krypten zeigen eine mittelstarke Anfärbung, die mehr homogen in den Zellen verteilt ist. Die Kerne treten nicht deutlich in Erscheinung. Das Zottenstroma und die Submucosa besitzen schwach positiv faserförmige Reaktion. Die Muscularis propria zeigt bei allen Dehydrogenasen eine deutliche Anfärbung (Abb. 2b S. 21). Im Jejunum bleibt die Farbintensität von Zottenhals bis Zottenspitze gleich und auch die Krypten zeigen etwa gleichstarken Reaktionsausfall wie



- Abb.2a: Histochemische Reaktion der LDH in Zottenspitzen des oberen Jejunums bei stärkerer Vergrößerung. Die Reaktion in den Epithelzellen ist durch eine breite supranucleäre, eine schmale infranucleäre und ganz schmale paranucleäre Aktivitätszone gekennzeichnet. Im Zottenstroma feiner faserförmiger Reaktionsausfall, der wahrscheinlich einzelnen glatten Muskelfasern entspricht. Die Topik der Reaktion ist bei allen Dehydrogenasen gleiartig. Vergr.: 200x
- b: Histochemische Reaktion der LDH in den Krypten und der Muscularis propria des oberen Jejunum bei stärkerer Vergrößerung. Vergr.: 200x

Zottenepithel. Die Aktivität im Ileumepithel nimmt auf mittelstark ab. Krypten und Zotten enthalten gleiche Reaktionsniederschläge. Die Becherzellen sind ohne Aktivität, sie wirken wasserklar (Abb. 3a-d S.23). Das Colonepithel ist bis auf den Grund der Krypten gleichmäßig mittelstark gefärbt (Abb. 4 S.24).

Das Verhalten der LDH im Duodenum ist ähnlich dem der SDH. Auch dieses Enzym zeigt supranucleäre, infranucleäre und paranucleäre Aktivität. Die Becherzellen und das Stroma sind negativ. Die Muscularis propria hebt sich leicht gefärbt davon ab. Im Jejunum bleibt die beschriebene Streifung erhalten. Der apikale Aktivitätsstreifen verschmälert sich deutlich, während der basale Streifen intracelluläre Kegel bildet, die mit ihrer Spitze zur Zellbasis zeigen. Die Krypten sind deutlich gefärbt. Im Ileum wirken die Aktivitätsstreifen verschmälert, zeigen aber eine sehr intensive Färbung. Die Krypten gleichen sich auch hier in der Farbtiefe dem Zottenepithel an. Das Colonepithel verursacht eine mittelstarke Reaktion, die homogen in den Zellen verteilt ist. Die Intensität nimmt zu den Krypten hin ab.

Das Enzym G6PDH zeigt die typische Dreistreifung des Epithelverbandes, wie sie für alle Dehydrogenasen charakteristisch ist. Gelegentlich stellen sich Zwischenzellgrenzen als helle Streifchen dar, die sich basal verbreitern. Im Zottenstroma heben sich Muskelfasern gegenüber dem negativen Bindegewebe ab. Der Stärkste Niederschlag im Jejunum befindet sich im apikalen Bereich der Zellen. Der basale Streifen kommt schwächer, aber noch deutlich zur Darstellung. Die Farbtintensität des verschmälerten Streifens bleibt gleich. Die Becherzellen treten als helle negative Epithelaussparungen hier besonders zahl-

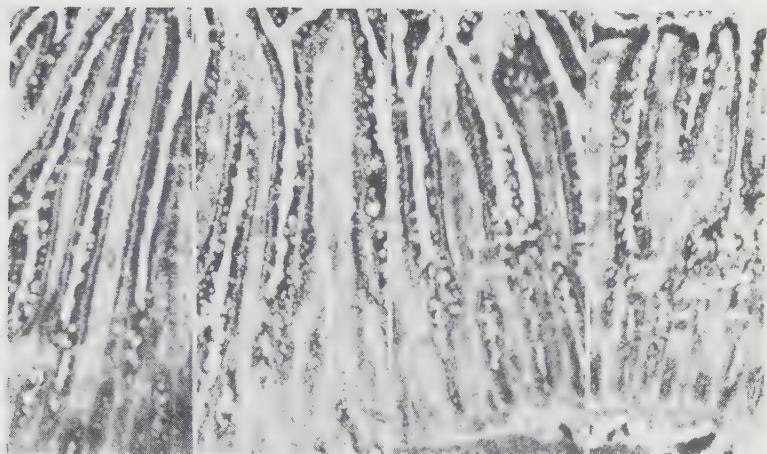


Abb.:3a-d: Histochemische Reaktion der LDH in Duodenum(a), oberem Jejunum(b), oberem Ileum(c) und unterem Ileum(d) zum Vergleich der Stärke des Reaktionsausfalles. Vergr.:85x

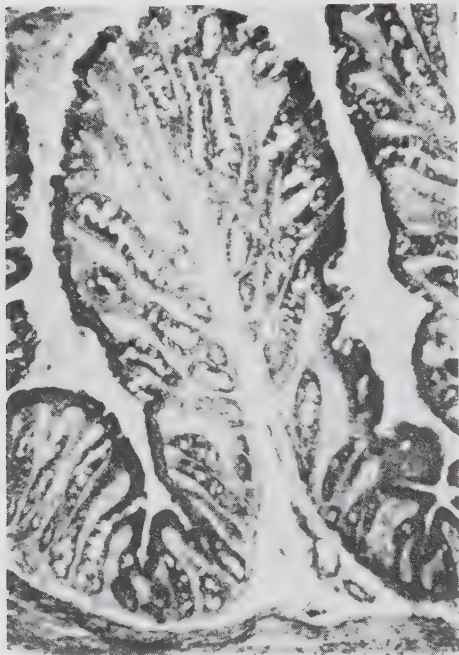


Abb.4: Histochemische Reaktion der LDH im Colon.
Vergr.:85x

reich auf. Im Ileum verliert die Zellbasis an Aktivität. In den Epithelzellen des Colon stellt sich apikal schwach, aber deutlich ein Streifen dar, während basalwärts die Farbintensität kontinuierlich in die Grundfärbung des Stromas übergeht. Die Aktivität nimmt zum Kryptenhals hin ab. In der Muscularis mucosae und Muscularis propria stellen sich Kapillaren und kleinste Gefäße dar. Im Gegensatz zu der SDH und LDH läßt die G6PDH somit ein deutliches Aktivitätsgefälle von stark im Duodenum bis schwach im Colon erkennen.

Das Verhalten der MAO im Darmepithel ähnelt dem der anderen Dehydrogenasen. Die Krypten und die Muscularis propria enthalten etwa gleiche mittelstarke Anfärbung. Demgegenüber hebt sich die Submucosa negativ ab. Die Enterocyten der Dünndarmzotten besitzen vom Kryptenhals bis zur Zottenspitze gleiche Aktivität. Das Duodenalepithel zeigt die zottenparallele Enterocytenstreifung am deutlichsten. Der sehr breite, apikale und der schmale basale Aktivitätsstreifen werden durch den hellen Kernstreifen getrennt. Die Breiten der Streifen verhalten sich wie 4:2:1. Der infranucleäre Streifen wird durch die Summe kleiner Aktivitätsflecken hervorgerufen. Paranucleär bestehen Aktivitätsbrücken. Die Enterocytenzwischenräume stellen sich gelegentlich als schmale helle Streifen dar. Das Colonepithel hat eine etwas geringere Aktivität als der Dünndarm. Eine den Dünndarmenterocyten analoge Streifung fehlt. Die Krypten- und Muscularisanfärbungen stimmen auch hier überein. Die Submucosa ist negativ.

Bei allen Dehydrogenasen sind zu den verschiedenen Tageszeiten wie bei der LAP keine Unterschiede in der histotopochemischen Verteilung wahrzunehmen, sondern nur in der Stärke

des Reaktionsausfalls, also der histochemischen Aktivität. Maxima und Minima dieser Tageszeitlichen Schwankungen werden bei der statistischen Auswertung beschrieben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß alle hier dargestellten Dehydrogenasen in den Oberflächenepithelien des Darmes, den sogenannten Enterocyten, einen weitgehend gleichen topochemischen Reaktionsausfall zeigen:

Eine breite apikale (supranucleäre) Zone, eine schmälere basale (infranucleäre) Zone und ganz schmale paranucleäre Zonen, die fehlen können. (Abb. 2a S. 21) Zwischen den einzelnen Darmabschnitten bestehen bei der SDH, der LDH und der MAO nur geringgradige Unterschiede, die sich darmabwärts in einen nur leichten Abfall der Fermentreaktion erkennen lassen, während bei der G6PDH ein deutlicher Abfall der Fermentreaktion in den distalen Darmabschnitten vorhanden ist. Ganz allgemein sind in den Epithelzellen die Unterschiede des histochemischen Reaktionsausfalls sowohl in den einzelnen Darmabschnitten, als auch zu den verschiedenen Tageszeiten, durch eine Verbreiterung oder Verschmälerung der beschriebenen Aktivitätszonen mit Verstärkung oder Abschwächung ihrer Farbtintensität wahrnehmbar.

STATISTISCHE AUSWERTUNG

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der statistischen Auswertung der visuell ermittelten Werte des histochemischen Reaktionsausfalles pro Enzym, Darmabschnitt und Zeiteinheit beschrieben. Diese statistischen Werte ergeben einen Maßstab für die relative Stärke der Enzymaktivitäten, d.h. es kann ein Anstieg oder Abfall des histochemischen Reaktionsausfalles in den verschiedenen Darmabschnitten und zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt werden. Mit der statistischen Auswertung soll vor allem Maxima und Minima des enzymhistochemischen Reaktionsausfalles erfaßt werden, um damit eine Aussage über circadiane Aktivitätsschwankungen der Enzyme machen zu können. Daneben werden auch die statistisch ermittelten Werte für die verschiedenen Darmabschnitte miteinander verglichen. In den Tabellen 6, 8, 10, 12 und 14 (s. Anhang) sind die Fallzahlen, die Mittelwerte mit Standardabweichung, die Varianz und die Varianzanalyse mit Ergebnissen für die einzelnen Darmabschnitte zu verschiedenen Tageszeiten wiedergegeben. Aus den Tabellen 6a, 8a, 10a, 12a und 14a (s. Anhang) kann abgelesen werden zwischen welchen Zeitpunkten in einem Darmabschnitt auffällige (+), oder signifikante (++) Unterschiede bestehen. Entsprechendes gilt für die Tabellen 7, 9, 11, 13 und 15 (s. Anhang), in denen für die einzelnen Zeitpunkte die verschiedenen Darmabschnitte zusammengefaßt sind mit den dazugehörigen Varianzanalysen. Ebenso wird in den Tabellen 7a, 9a, 11a, 13a und 15a (s. Anhang) ersichtlich, zwischen welchen Darmabschnitten zu jedem Zeitpunkt mehr als zufällige Unterschiede in der Enzymaktivität bestehen.

In allen Dünndarmabschnitten ist bei der LAP (Tab.6 und 6a s.Anhang) ein Aktivitätsminimum um 12Uhr signifikant gegenüber den Zeitpunkten mit höherer Aktivität 4Uhr, 16Uhr und 20Uhr. Im Duodenum zeigt die LAP neben dem Minimum im Tagesverlauf keine Schwankungen. Im oberen und unteren Jejunum ist der 16Uhr Wert signifikant, bzw. auffällig gegen 24Uhr, Im oberen Ileum zeigt das 4Uhr Maximum zusätzlich Signifikanz gegen 8Uhr, 20Uhr und dem zweiten Minimum 24Uhr. Die Aktivitätsschwankungen sind einem Tag-Nachtrhythmus zuzuordnen. Das Tagestief liegt um 12Uhr, die höheren Aktivitäten um 4Uhr morgens und um 16Uhr nachmittags. Im unteren Jejunum zeigt sich ein zweites auffälliges Minimum um 24Uhr, das weiter caudal signifikant wird.

Darmabwärts (Tab.7/7a s.Anhang) steigt die Aktivität der LAP von Duodenum bis oberem Ileum zu allen Zeitpunkten signifikant an. Zum unteren Ileum besteht eine Aktivitätsverminderung, die zu den Zeitpunkten 24Uhr, 4Uhr und 8Uhr signifikant abfällt. Im Colon zeigt sich zu allen Zeitpunkten keine Anfärbung. Die absolut höchste Aktivität wurde um 4Uhr im oberen Ileum gefunden.

Die errechneten Mittelwerte sind in Abb.5 (S.29) mit ihren Standardabweichungen zu den verschiedenen Zeitpunkten für die einzelnen Darmabschnitte graphisch dargestellt.

Das Maximum der SDH (Tab.8/8a s.Anhang) um 8Uhr zeigt signifikante Aktivitätsunterschiede gegenüber 12Uhr, 16Uhr, 20Uhr und 24Uhr in allen Darmabschnitten, ausgenommen unterem Ileum. Im Duodenum und oberen Jejunum ist im Tagesverlauf keine weitere Enzymschwankung vorhanden. Demgegenüber zeigen die caudalen Darmabschnitte ein weiteres Maximum um 20Uhr;

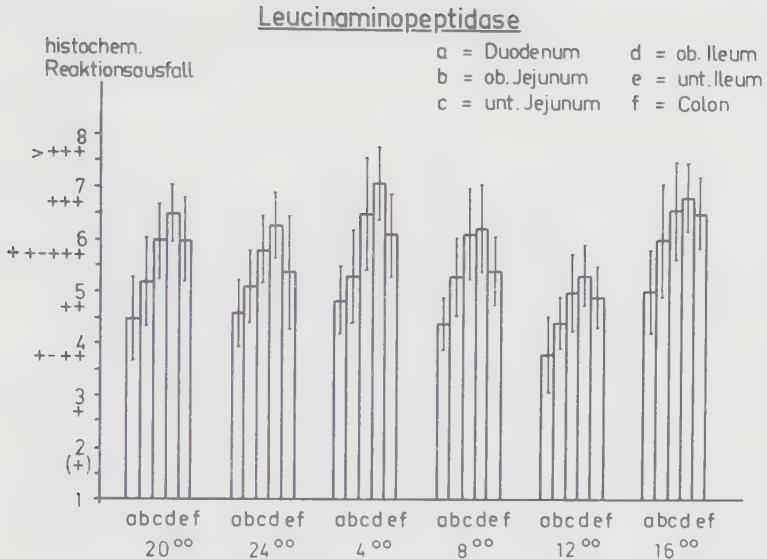


Abb. 5: Diagramm der Stärke des histochemischen Reaktionsausfalles der LAP in den einzelnen Darmabschnitten zu verschiedenen Tageszeiten. Die Höhe der Säulen entspricht den errechneten Mittelwerten mit eingezeichneter Standardabweichung. Auf der Ordinate sind der Bewertung für die statistische Überprüfung des histochemischen Reaktionsausfalles (1-8) die histochemisch gebräuchlichen Stärkegrade (+-+++) zugeordnet. (Nähere Erklärung S. 10)

im unteren Jejunum nur auffällig gegenüber 24Uhr, wird es im Ileum und Colon signifikant gegenüber dem Tag- und Nachtmimum 12Uhr und 24Uhr. Das Enzym zeigt somit starke tagesrhythmische Schwankungen.

Darmabwärts (Tab.9/9a s.Anhang) bewegt sich die Aktivität der SDH zu allen Zeitpunkten in den ersten drei Darmsegmenten innerhalb einer Bewertungsstufe, um dann signifikant zwischen unterem Jejunum und oberem Ileum abzufallen. Nur um 4Uhr und 8Uhr steigt die Colonaktivität gegenüber dem Ileum an (Abb.6 S.31 graph.Darstellung).

Das Duodenum zeigt bei der LDH (Tab.10/10a s.Anhang) nur als 8Uhr Maximum einen auffälligen Unterschied gegenüber dem Tagestief um 16Uhr; während im oberen Jejunum ein 24Uhr Maximum signifikant gegen 20Uhr, 4Uhr und auffällig ist gegenüber dem Nachmittagswert 16Uhr. Beide Maxima 8Uhr und 24Uhr heben sich im unteren Jejunum signifikant ab gegen die Aktivitäten um 20Uhr, 4Uhr und 16Uhr. Im oberen Ileum bleibt die höhere Aktivität um 8Uhr signifikant gegen 4Uhr, 20Uhr und dem ausgeprägten Tief, das noch gegenüber 16Uhr einen auffälligen Unterschied zeigt. Das untere Ileum und Colon zeigt keine Signifikanz. Nur im Colon besteht ein auffälliger Unterschied zwischen 20Uhr und dem Minimum 4Uhr.

Darmabwärts steigt die LDH (Tab.11/11a s.Anhang) zu allen Zeitpunkten signifikant von mittelstark im Duodenum bis auf stark im distalen Jejunum an. Danach fällt die Aktivität ab zum Ileum und Colon, wobei zu allen Tageszeiten der Unterschied zwischen Jejunum und unterem Ileum, bzw. Colon signifikant ist (Abb.7 S.32 graph.Darstellung)

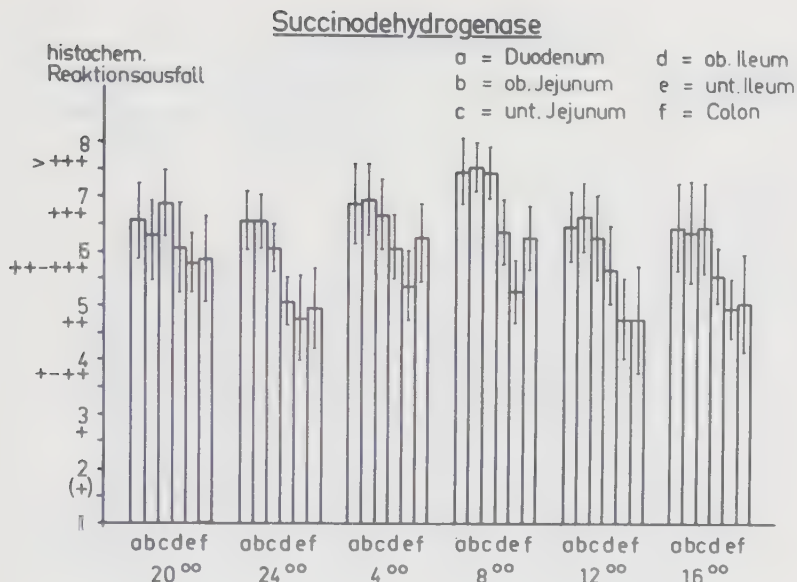


Abb. 6: Diagramm der Stärke des histochemischen Reaktionsausfalles der SDH in den einzelnen Darmabschnitten zu verschiedenen Tageszeiten. Die Höhe der Säulen entspricht den errechneten Mittelwerten mit eingezeichneter Standardabweichung. Auf der Ordinate sind der Bewertung für die statistische Überprüfung des histochemischen Reaktionsausfalles (1-8) die histochemisch gebräuchlichen Stärkegrade (+-+++) zugeordnet. (Nähere Erklärung S. 10)

Laktatdehydrogenase

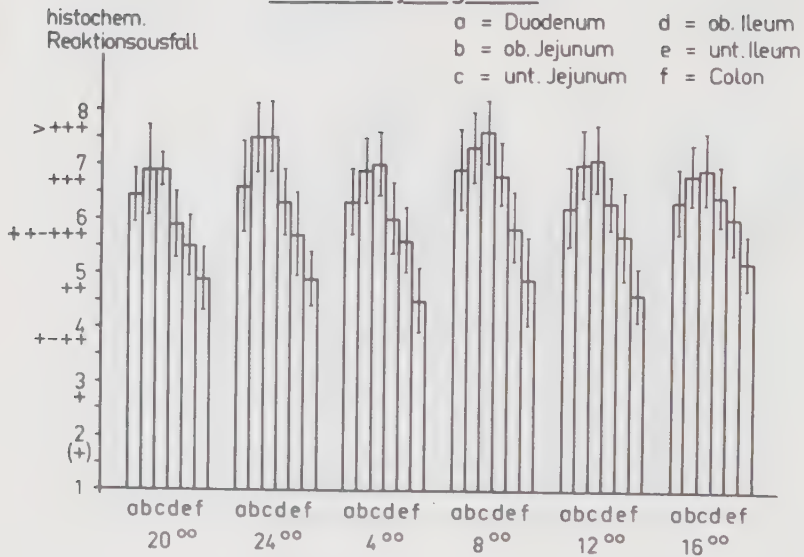


Abb. 7: Diagramm der Stärke des histochemischen Reaktionsausfalles der LDH in den einzelnen Darmabschnitten zu verschiedenen Tageszeiten. Die Höhe der Säulen entspricht den errechneten Mittelwerten mit eingezeichneter Standardabweichung. Auf der Ordinate sind der Bewertung für die statistische Überprüfung des histochemischen Reaktionsausfalles (1-8) die histochemisch gebräuchlichen Stärkegrade (+-+++) zugeordnet. (Nähere Erklärung S.1d)

Die G6PDH (Tab. 12/12a s. Anhang) zeigt schwache tageszeitliche Schwankungen im Duodenum, proximalen Jejunum und Colon. Im ersten Darmabschnitt ist das 8Uhr Maximum signifikant gegen das Minimum um 4Uhr. Diese Aktivitätsunterschiede sind im oberen Jejunum noch auffällig, während Signifikanz zwischen dem 20Uhr Tief und dem morgentlichen 8Uhr Hoch besteht. Im Colon liegt die Aktivität zu den Tageszeiten 4Uhr, 8Uhr und 12Uhr und 16Uhr höher, als um 20Uhr und 24Uhr. Dabei zeigt sich der Unterschied zwischen 20Uhr und 16Uhr als signifikant, der Unterschied zwischen 16Uhr und 24Uhr noch auffällig. Darmabwärts (Tab. 13/13a s. Anhang) verlieren alle Darmabschnitte signifikant an G6PDH-Aktivität von duodenal stark bis zum schwach aktivem Colon. Nur zwischen Duodenum und oberem Jejunum um 4Uhr und 8Uhr besteht kein Unterschied. Auffällig sind die Aktivitätsdifferenzen von oberem und unterem Ileum um 24Uhr, von Duodenum und proximalem Jejunum um 12Uhr und 16Uhr. Weiterhin sind um 16Uhr die Aktivitätsunterschiede von Duodenum abwärts zum unteren Ileum zwischen den sich jeweils folgenden Darmsegmenten auffällig. (Abb. 8 S. 34 graph. Darstellung)

Bei der MAO (Tab. 14/14a s. Anhang) ist im Duodenum die maximale Aktivität um 8Uhr signifikant gegen die Zeitpunkte mit niedriger Aktivität 20Uhr, 12Uhr und auffällig gegen 16Uhr. Danach ist das 12Uhr Minimum auffällig unterschieden zum höheren 4Uhr Wert. Im proximalen Jejunum ist die Aktivität um 4Uhr signifikantes Maximum gegenüber 20Uhr, 24Uhr, 12Uhr und 16Uhr. Auch der morgentliche 8Uhr Wert ist noch signifikant gegen das 16Uhr Minimum. Auffällige Unterschiede bestehen zwischen den Zeitpunkten 8Uhr und 12Uhr, daneben auch zwischen 20Uhr und 16Uhr. Im distalen Jejunum ist das 4Uhr

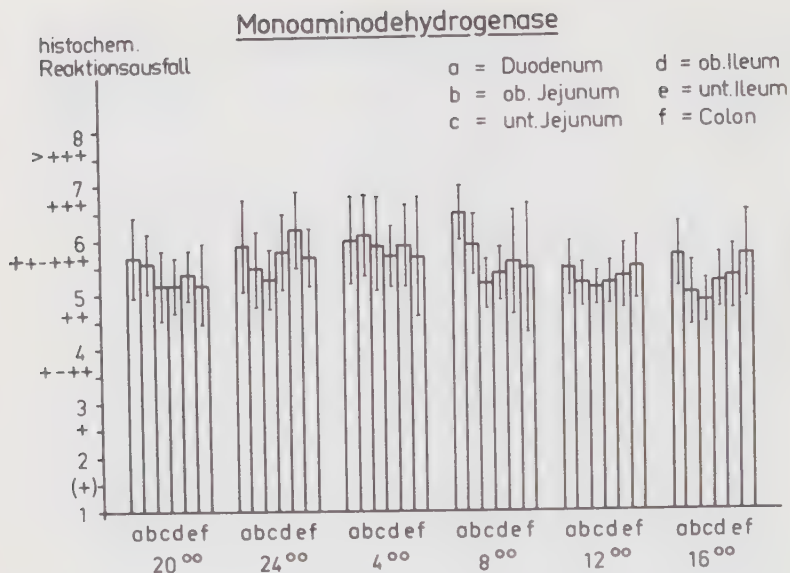


Abb. 9: Diagramm der Stärke des histochemischen Reaktionsausfalles der MAO in den einzelnen Darmabschnitten zu verschiedenen Tageszeiten. Die Höhe der Säulen entspricht den errechneten Mittelwerten mit eingezeichnete Standardabweichung. Auf der Ordinate sind der Bewertung für die statistische Überprüfung des histochemischen Reaktionsausfalles (1-8) die histochemisch gebräuchlichen Stärkegrade (+-++) zugeordnet. (Nähere Erklärung S. 1d)

Maximum signifikant gegen alle fünf Zeitpunkte. Außerdem bestehen auffällige Unterschiede zu den Zeiten 20Uhr und 24Uhr gegenüber dem Tagesminimum 16Uhr. Im Ileum ist der Zeitpunkt 24Uhr Maximum und signifikant gegen 20Uhr, 12Uhr und 16Uhr, im distalen Teil daneben noch auffällig gegen 8Uhr. Das Colon zeigt nur zufällige tageszeitliche Aktivitätsschwankungen.

Darmabwärts zeigt die Aktivität der MAO (Tab. 15/15a s. Anhang) nur zufällige Schwankungen zu den Zeiten 20Uhr, 4Uhr und 12Uhr. Dagegen unterscheidet sich um 24Uhr die hohe Aktivität im distalen Ileum signifikant von der im Jejunum und auffällig von der im Colon. Um 8Uhr ist die Duodenalaktivität gegen alle übrigen Darmsegmente signifikant höher. Zum Zeitpunkt 16Uhr fällt die hohe Aktivität im Duodenum ab bis zum unteren Jejunum, um in Richtung Colon wieder anzusteigen. Signifikante Unterschiede ergeben sich dabei zwischen Duodenum und allen übrigen Dünndarmabschnitten, daneben auch zwischen Colon und Jejunum und unterem Ileum. (Abb. 9 S 36 graph. Darstellung)

Glukose - 6 - phosphatdehydrogenase

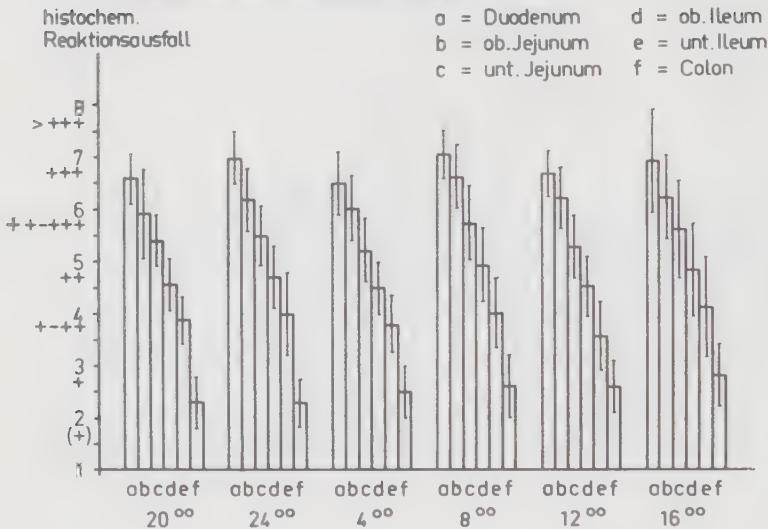


Abb. 8: Diagramm der Stärke des histochemischen Reaktionsausfalles der G6PDH in den einzelnen Darmabschnitten zu verschiedenen Tageszeiten. Die Höhe der Säulen entspricht den errechneten Mittelwerten mit eingezeichnete Standardabweichung. Auf der Ordinate sind der Bewertung für die statistische Überprüfung für die histochemischen Reaktionsausfalles (1-8) die histochemisch gebräuchlichen Stärkegrade (+-++) zugeordnet. (Nähere Erklärung S.10)

VI. DISKUSSION

Während relativ viele Untersuchungen vorliegen, die sich mit der histotopochemischen Verteilung von Enzymen in der Darm-schleimhaut befassen, sind über tagesrhythmische Veränderungen bisher keine enzymhistochemischen Befunde erhoben worden. Es ergibt sich daher von selbst, daß die Diskussion in zwei Teile zerfällt, von denen im ersten Teil die eigenen Befunde mit den in der Literatur vorliegenden enzymhistochemischen Untersuchungen am Darm verglichen werden und von denen sich der zweite Teil mit tageszeitlich bedingten Veränderungen befaßt, wobei in diesem Teil zum Vergleich nur Befunde an anderen Organen herangezogen werden können.

DISKUSSION ZUR HISTOTOPOCHEMISCHEN VERTEILUNG DER DARGESTELLTEN ENZYME

Von den hier dargestellten Enzymen unterscheidet sich die LAP entsprechend ihrer Stoffwechselfunktion als Hydrolase in ihrem histotopochemischen Verhalten grundsätzlich von den übrigen Enzymen, die als Dehydrogenasen eine weitgehend gleichartige intracelluläre Lokalisation erkennen lassen.

Die LAP ist in den Mikrovilli, dem Golgi-Apparat, sowie in der lateralen und basalen Zellmembran der Oberflächenepithelien lokalisiert und diese Verteilung entspricht somit Befunden wie sie von anderen Untersuchungen (Dawson und Pryse-Davies 11; Frič und Lojda 18; Klein und Mitarb. 32; Iwai 27; Shnitka 58; Vollrath 64) für dieses Enzym und andere Hydrolasen sowohl bei der Ratte, als auch bei anderen Spezies erhoben wurden. Wie bei den hier vorliegenden Untersuchungen finden die zitierten Autoren bei fast allen untersuchten Spezies die Kryptenepithelien, die Becherzellen und die Colonschleimhaut frei von LAP. Nur in der menschlichen Colonschleimhaut werden von Shnitka (58) und Iwai (27) Aktivitätsflecken im Oberflächen- und Kryptenepithel beschrieben. Im Gegensatz zu Iwai (27), der in den Epithelzellen der Zottenspitzen eine starke Aktivität der LAP fand, ist in unseren Untersuchungen die Reaktion in den Zottenspitzen etwas abgeschwächt und häufig negativ. Einen gleichen Befund können Nachlas und Mitarbeiter (49) beim Hund erheben. Die Aktivität steigt vom Duodenum bis oberem Ileum signifikant an. Dies gilt für alle Zeitpunkte. Iwai (27) bestätigt das für Ratte und Maus; beim Menschen und Meerschweinchen findet er dagegen gleichbleibende Aktivität darmabwärts.

Alle hier dargestellten Dehydrogenasen zeigen in den Oberflächenepithelien einen weitgehend gleichen topochemischen Reaktionsausfall. Zwischen einem breiten supranucleären und einem schmalen infranucleärem Aktivitätsstreifen finden sich häufig ganz schmale paranucleäre Aktivitätsbrücken. Diese Verteilung entspricht der intracellulären Anordnung der Mitochondrien in denen die Dehydrogenasen ihre Wirkung entfalten (Dawson und Pryse-Davies 11; Iwai 27; Klein und Mitarb. 32). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Dehydrogenasen betreffen vor allem die Stärke des Reaktionsausfalls in den verschiedenen Darmabschnitten, sowie das Verhältnis des Reaktionsausfalls zwischen Zotten und Krypten. So bleibt bei der SDH in den drei obersten Darmabschnitten zu allen Zeitpunkten die Reaktion weitgehend gleichmäßig stark und fällt im Ileum und Colon nur geringgradig ab. Bei der LDH verstärkt sich die Reaktion vom Duodenum bis zum unteren Jejunum etwas, um dann bis auf mittlere Stärke im Colon abzufallen. Während bei der MAO die niedrigste, aber noch mittelstarke Aktivität in den Oberflächenepithelien des unteren Jejunums zu finden ist, zeigt die G6PDH als einzige Dehydrogenase darmabwärts einen kontinuierlichen Aktivitätsabfall von sehr stark (+++) im Duodenum bis deutlich (+)-+) im Colon. Diese Verteilung der Dehydrogenasen in den einzelnen Darmabschnitten entspricht weitgehend den in der Literatur erhobenen Befunden, wie sie in Tab. 1-5 (S. 15/16/17) zusammengefaßt sind. Lediglich Iwai (27) findet bei der MAO keine Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Darmabschnitten, wohingegen Jervis (29) eine mit diesen Untersuchungen vergleichbare Verteilung der MAO beim Meerschweinchen und Kaninchen beschreibt. Die Aktivität der MAO scheint

nicht bei allen untersuchten Spezies in gleicher Stärke vorhanden zu sein. So fanden Levine und Sjoerdsma (38) bei einer vergleichenden Untersuchung im menschlichen Jejunum eine 5mal höhere Aktivität der MAO als im Jejunum der Ratte. Vielleicht ist dieser Befund mit der bereits erwähnten Entgiftungsfunktion der MAO für biogene Amine in Zusammenhang zu bringen, worauf auch der von Lojda und Mitarbeiter (39) zwischen Leberzellen und Enterocyten herangezogene Vergleich hinweist, da in den Enterocyten die Aktivität der MAO viel höher ist, als in den Leberzellen. Während in den Epithelzellen der Zotten die Enzymaktivität von Darmabschnitt zu Darmabschnitt meist wechselt, bleibt in den Epithelzellen der Krypten die Aktivität in allen Darmabschnitten meist konstant. Für alle Dehydrogenasen ist in den Kryptenepithelien eine Aktivität nachweisbar, die bei der SDH als mäßig stark, bei der LDH als stark und bei der G6PDH und MAO als schwach einzustufen ist. Übereinstimmende Befunde werden nicht nur bei der Ratte, sondern auch beim Menschen, Hund, Esel und Schimpansen erhoben (Frič und Lojda 18; Iwai 27; Jos und Mitarb. 30; Klein und Mitarb. 32; Kubat und Koldowsky 34; Nachlas und Mitarb. 48; Spiro 60; Vollrath 64). In diesem Zusammenhang soll ein Befund herausgestellt werden, der bisher noch nicht beschrieben worden ist: Bei allen untersuchten Enzymen weist das Kryptenepithel des Dünndarms weitgehend ähnliche Enzymaktivitäten auf wie das Colonepithel. Besonders deutlich zeigt sich dieser Befund bei der LAP, bei der Dünndarmkrypten und Colonepithel negativ sind.

DISKUSSION ZU DEN TAGESRHYTHMISCH BEDINGTEN SCHWANKUNGEN

Ganz allgemein betreffen Veränderungen des histochemischen Reaktionsausfalls eines Enzyms, wie sie durch experimentelle oder physiologische Einflüsse hervorgerufen werden können, entweder dessen topochemische Verteilung oder/und dessen Aktivitätsstärke. Bei keinem der in dieser Arbeit histochemisch dargestellten Enzyme konnten Unterschiede in der topochemischen Verteilung zu den verschiedenen Tageszeiten wahrgenommen werden. Dagegen finden sich bei der statistischen Auswertung der visuell ermittelten Stärke des histochemischen Reaktionsausfalls, die einen Maßstab der relativen Enzymaktivität darstellt, zu den verschiedenen Zeitpunkten z.T.

ausgeprägte Unterschiede, die die Aufstellung von Aktivitätsmaxima und -minima gestatten. Betrachtet man die fünf hier dargestellten Enzyme unter diesem Gesichtspunkt, so lassen sie sich in zwei Gruppen zusammenfassen:

Die erste Gruppe, zu der die Enzyme LAP, SDH und LDH gehören, ist durch zwei Aktivitätsmaxima charakterisiert. Der ausgeprägte Wert liegt in den Morgenstunden und wurde für die LAP zu dem Untersuchungszeitpunkt 4 Uhr, für die SDH und LDH um 24 und 8 Uhr gefunden. Nach dem Aktivitätsabfall im Laufe des Morgens liegt bei allen drei Enzymen das signifikante Tagesminimum um 12 Uhr. In den Abendstunden findet sich der zweite Aktivitätsgipfel zu den Untersuchungszeitpunkten 16 Uhr für die LAP, 20 Uhr für die SDH und 24 Uhr für die LDH. Ein zweites Aktivitätsminimum wurde für die LAP und SDH um 24 Uhr, für die LDH um 4 Uhr gefunden. Der Aktivitätsverlauf dieser drei Enzyme entspricht dem von Aschoff (1) erkannten Bigrünus für alle circadianrhythmisch verlaufenden Parameter.

Das zeitlich längere und aktivitätsniedrigere Minimum liegt während der Lichtperiode, das kürzere zu einem nächtlichen Untersuchungszeitpunkt oder in den frühen Morgenstunden.

Die zweite Gruppe der untersuchten Enzyme wird durch nur ein Aktivitätsmaximum charakterisiert. Sowohl bei der MAO, wie auch der G6PDH liegt das Maximum zum Untersuchungszeitpunkt 8 Uhr. Im weiteren Verlauf zeigt die G6PDH kaum Circadianrhythmik, d.h. die übrigen Aktivitätsunterschiede liegen innerhalb der Größenordnung einer Bewertungsstufe. Trotzdem zeigt das Bild synchron mit den anderen Enzymen höhere Aktivitäten morgens um 8 Uhr und nachmittags um 16 Uhr, und ein Tages- und Nacht-tief um 12 Uhr, bzw. um 4 Uhr, wobei die Unterschiede jedoch statistisch nicht gesichert sind. Während bei der G6PDH alle Darmabschnitte synchron im Circadianrhythmus schwingen, zeigt die MAO ein besonderes Verhalten. Bei ihr durchlaufen die einzelnen Darmabschnitte zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihr Aktivitätsmaximum. Während im Duodenum das Maximum zum Untersuchungszeitpunkt 8 Uhr liegt, verschiebt es sich darmabwärts im Jejunum auf 4 Uhr und im Ileum auf 24 Uhr.

Während über das Bestehen und über die Äußerungen tagessrhythmischer Veränderungen in verschiedener Hinsicht (Biochemie, Histologie, Verhaltensbiologie u.s.w.) eine ausgedehnte Literatur existiert (Zusammenfassungen: Aschoff 1; Bünning 6; Conroy 9; Halberg 23; v. Mayersbach 41; Withrow 65; Wolf 67), ist über tageszeitliche Schwankungen von Enzymaktivitäten in Zellen, Geweben und

Organen normaler Individuen sowohl in der Biochemie, als auch in der Histologie bisher wenig bekannt. Die ersten Veröffentlichungen tagesrhythmischer Schwankungen von Enzymen erschienen in der Botanik (Bünning 4,5; Ehrenberg 14; Richter 55; Rubin 56; Venter 62). Richter (55) berichtet von Enzymen mit und ohne Aktivitätsschwankungen. Er kann bei der Trioseisomerase Aldolase und G6PDH keine Veränderungen finden, trotz unterschiedlicher Beleuchtungsperioden.

In tierexperimentellen Untersuchungen haben vor allem v. Mayersbach und seine Arbeitsgruppe (v. Mayersbach und Mitarb. 44; v. Mayersbach und Yap 46; Yap 69,70) auf bedeutende Schwankungen enzymhistochemischer Reaktionsausfälle hingewiesen, wobei die tagesperiodischen Unterschiede des enzymhistochemischen Reaktionsausfalls der SDH und der unspezifischen Esterase durch biochemische Kontrollen bestätigt werden konnten. Tagesschwankungen des histochemischen Reaktionsausfalls der Amylophosphorylase in der Mäuseleber (Egli 13) können mit den bekannten histochemisch erfaßbaren tagesrhythmischen Änderungen im Glykogengehalt der Leber (Forsgren 16; Leske 35,36,37; v. Mayersbach und Leske 43) in Korrelation gesetzt werden. Schon früher konnten biochemisch tagesperiodische Schwankungen von Enzymaktivitäten festgestellt werden, die auf eine ausgeprägte Abhängigkeit des gesamten Stoffwechsels vom Tagesrhythmus hinweisen: So beschreiben Holmgren und Svanborg (26) in der Leber von Versuchstieren tagesrhythmische Schwankungen der alkalischen und sauren Phosphatase, Frajola (17), sowie Fuller und Snoddy (19) der α -Ketoglutarat-Transaminase-Aktivität und Wurtmann (68), sowie

Civen und Mitarbeiter (8) der Tyrosin-Transaminase-Aktivität. Im Hypothalamus der Wachtel fand Follet (15) ausgeprägte tagesrhythmische Veränderungen der MAO-Aktivität. Mayersbach und die wissenschaftliche Gruppe um ihn haben umfangreiche Untersuchungen veröffentlicht, aus denen für die Circadianforschung besonders in der Beurteilung von Ergebnissen verschiedener Untersuchungen wesentliche Schlüsse zu ziehen sind. (v. Mayersbach und Yap 45, 46; v. Mayersbach und Mitarb. 44; Yap 70). Durch wiederholte Versuche gefundene Ergebnisse zu reproduzieren ergaben sich mindestens fünf Parameter, die beim Vergleich verschiedener Untersuchungen zu Verfälschungen führten. Erstens die jahreszeitlichen Veränderungen der Fließgleichgewichte verursachen die erhebliche Phasenverschiebung in der Lage der Maxima und Minima der Aktivitäten. Von besonderer Bedeutung in diesem Zusammenhang sind in erster Linie die Belichtungsverhältnisse, da die Beleuchtung als ein Hauptzeitgeber physiologischer Aktivitätsschwankung erkannt worden ist (Wohlrab 66). Zweitens der circadiane Rhythmus bei beiden Geschlechtern unterscheidet sich nicht nur in der Höhe der Aktivität ganz erheblich, sondern auch in der Lage der Tagesmaxima. Daraus folgert, daß eine Untersuchung mit männlichen und weiblichen Ratten gegensätzliche Ergebnisse liefern kann, je nachdem zu welchem Zeitpunkt des Tages die Versuche durchgeführt wurden. Drittens ergeben sich exogene Einflüsse, die trotz konstanter Unterbringung weiter wirken und mit der örtlichen Lage erklärt werden. Viertens weist v. Mayersbach darauf hin, daß auch Qualitätsunterschiede zwischen den Zuchten gleicher Spezies bestehen. Fünftens ergeben sich bei histochemischen Un-

tersuchungen allgemein Schwankungen der Ergebnisse durch eine tagesrhythmisch unterschiedliche Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber verschiedenen Fixierungsmitteln (Leske 37). Aus diesen Gründen ist es nur sehr schwer möglich Resultate verschiedener Versuchsserien miteinander zu vergleichen, besonders was die genaue zeitliche Phasenlage von Maxima und Minima der Aktivitäten betrifft. Trotzdem läßt sich aus allen Untersuchungen zur Tagesperiodik ein Grundmuster der Aktivität herauskristallisieren, das einem Bigeminus (Aschoff 1) entspricht, wobei das Hauptmaximum in der Regel zu Beginn, das Nebenmaximum gegen Ende der Hauptaktivitätszeit liegt (Wohlrab 66). Entsprechend unterschiedlich ist die Phasenlage dieses Bigeminus bei licht- und dunkelaktiven Tieren, d.h. bei dunkelaktiven Tieren, wie bei der Ratte und Maus liegt ein Aktivitätsgipfel in den späten Nachmittagsstunden oder Abendstunden und ein zweiter Aktivitätsgipfel in den frühen Morgenstunden und das Aktivitätsminimum zur Haupttageszeit. Auch die meisten der zitierten an Ratten oder Mäusen durchgeführten enzymhistochemischen und enzymbiochemischen Untersuchungen, sowie die eigenen Untersuchungen lassen sich diesem Grundmuster der Tagesperiodik dunkelaktiver Tiere zuordnen, wobei besonders das für alle Enzyme um 12 Uhr in Erscheinung tretende Aktivitätsminimum die Richtigkeit dieser Zuordnung unterstreicht.

Halberg (23) konnte zeigen, daß tagesperiodische Schwankungen einer großen Zahl physiologischer Faktoren von einem 24 Stundenrhythmus der Nebennierenrindentätigkeit, dem sogenannten Adrenalocyclus, abhängig sind. Dieser Funktionsrhythmus der Nebennierenrinde läßt sich direkt biochemisch fassen in circadianen Schwankungen des Blutkorticosteron-

gels und der Harnausscheidung von 17-Ketosteroiden, Kortikosteroiden und Aldosteron (Haus und Halberg 24), aber auch durch circadian-periodische Schwankungen der Aktivität von Enzymosystemen in der Nebenniere selbst wie Glick (21) an der SDH-Aktivität der Rattennebeniere zeigen konnte. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß dieser Adrenalcyclus auch als Induktor für die tagesperiodischen Schwankungen der Enzyme der Darmschleimhaut verantwortlich ist, da Verzáar und Mitarbeiter (63), sowie Lüthy und Verzáar (40) für zwei Enzyme der Darmschleimhaut, der alkalischen Phosphatase und der Adenosin-triphosphatase, eine Aktivitätsabhängigkeit von der Nebennierenrinde nachweisen konnte.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In Gefrierschnitten von Duodenum, proximalen und distalen Jejunum, proximalen und distalen Ileum und Colon von männlichen Albinoratten (Stamm Sprague-Dawley) mit einem Gewicht zwischen 240 und 270 Gramm wurden folgende Enzyme zu sechs verschiedenen Tageszeiten dargestellt: LAP, SDH, LDH, G6PDH und MAO.

Im ersten Teil der Arbeit wird der histotopochemische Reaktionsausfall für die einzelnen Enzyme beschrieben und in den verschiedenen Darmabschnitten miteinander verglichen. Alle Dehydrogenasen zeigen in den Epithelzellen eine weitgehend gleiche Topik. Im Colon entspricht die Stärke des Reaktionsausfalles etwa der Stärke der Krypten des Dünndarms. Die LAP ist in den Dünndarmkrypten und im Colon negativ.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die visuell ermittelte Stärke der histochemischen Aktivität der Enzyme für die einzelnen Darmabschnitte und zu sechs verschiedenen Tageszeiten statistisch ausgewertet, um Maxima und Minima des histochemischen Reaktionsausfalles zu erfassen, die einer Circadianrhythmik zugeordnet werden können. Unter diesem Gesichtspunkt lassen sich die fünf dargestellten Enzyme in zwei Gruppen zusammenfassen:

Die erste Gruppe, zu der die Enzyme LAP, SDH und LDH gehören, ist durch zwei Aktivitätsmaxima charakterisiert. Die Werte liegen für die LAP morgens um 4 Uhr, für die SDH und LDH um 8 Uhr. In den Abendstunden, bzw. Nachtstunden findet sich der zweite Aktivitätsgipfel zu den Untersuchungszeitpunkten 16 Uhr für die LAP, 20 Uhr für die SDH und 24 Uhr für die LDH.

Das Tagesminimum für alle Enzyme in den Darmabschnitten ist 12Uhr. Ein zweites Tief findet sich für die LAP und SDH um 24Uhr, für die LDH um 4Uhr. Der Aktivitätsverlauf dieser drei Enzyme entspricht dem in der Literatur beschriebenen Bigeminus für viele circadianrhythmisch verlaufende Parameter. Die zweite Gruppe der untersuchten Enzyme wird durch nur ein Maximum charakterisiert. Bei der G6PDH und dem Duodenum und proximalen Jejunum der MAO liegt das Maximum zum Untersuchungszeitpunkt 8Uhr. Im weiteren Verlauf zeigt die G6PDH kaum Circadianrhythmik. Die MAO zeigt ein besonderes Verhalten. Bei ihr durchlaufen die einzelnen Darmabschnitte ihr Aktivitätsmaximum zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

In der Diskussion werden die eigenen Befunde den aus der Literatur bekannten circadianrhythmisch bedingten Schwankungen von enzymhistochemischen Reaktionsausfällen in anderen Organen, besonders der Leber gegenübergestellt. Nach Berücksichtigung der Parameter, die zu Verfälschungen der Resultate führen können, lassen sich die eigenen Ergebnisse dem bekannten Grundmuster der Aktivität dunkelaktiver Tiere zuordnen. Somit kann angenommen werden, daß auch die Enzymsysteme der Darmschleimhaut den von anderen Organen (Leber, Nebenniere, Hypophyse) bekannten tagesperiodischen Schwankungen unterliegen.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

1. Aschoff, J. Exogene und endogene Komponente der 24-Stundenperiodik bei Tier und Mensch.
Naturwissenschaften 42, 569-575, (1955)
2. Bertalanffy, F.D. Mitotic rates and renewal times of the digestive tract epithelia in the rat.
Acta anat. (Basel) 40, 130-148, (1960)
3. Bretfeld, V. Histochemische Studie an der Milchdrüse.
med. Diss. Mainz, (1966)
4. Bünning, E. Untersuchungen über den physiologischen Mechanismus der endogenen Tagesrhythmik.
Ztschr. f. Bot. 37, 433, (1942)
5. Bünning, E. Über die photophile und skotophile Phase der endogenen Tagesrhythmik.
Planta 37, 337-345, (1950)
6. Bünning, E. Die physiologische Uhr.
2. Auflage Berlin-Heidelberg, (1963)
7. Champbell, R.C. Statistische Methoden für Biologie und Medizin. Übersetzt von Peter Ihm.
Stuttgart (1971)

8. Civen, M., Brown, C.B. und D.K. Granner: Biosynthetic control of the diurnal rhythm of tyrosinoheteroglutarat-transaminase activity in rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 39,
290-295, (1970)
9. Conroy, R.T. und J.N. Mills: Human Circadian Rhythms.
London (1970)
10. Davison, A.N.: Physiological role of monoamine oxidase.
Physiol. Rev. 38, 729-747, (1958)
11. Dawson, J. und J. Pryse-Davies: The distribution of certain enzyme systems in the normal human gastrointestinal tract.
Gastroenterology 44, 745-760, (1963)
12. Eder, M.: Der histochemische Nachweis des Fermentes Monoaminoxidase.
Beitr. path. Anat. 117, 343-396, (1957)
13. Egli, K.: Histochemische Untersuchungen der Amylophosphorylase in der Mäuseleber, physiologische Tagesschwankungen und postnatale Entwicklung.
Anat. Rec. 104, 189-216, (1967)
14. Ehrenberg, M.: Beziehungen zwischen Fermenttätigkeit und Blattbewegung Phaseolus Multiflorus unter verschiedenen Photoperiodischen Bedingungen.
Planta Bd. 38, 244-279, (1950)

23. Halberg, F.: Physiologic 24-hour periodicity: General and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch. 10, 225-296, (1959)
24. Haus, E. und F. Halberg: Der circadiane Adrenalzyklus und seine Bedeutung für die Reaktionsbereitschaft der Nebennierenrinde. Wien Z. Inn. Med. 43, 361-370, (1962)
25. Himmelhoch, S. R. und P. Karnowsky: The histochemical Demonstration of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. J. Biophys. biochem. Cytol. 9, 573-581, (1961)
26. Holmgren, H. J. und A. Svanborg: Variations of the acid and alkaline phosphatase activity in the liver of white rats during 24-hours period. Acta med. scand. 137, 187-195, (1950)
27. Iwai, N.: Histochemical studies of small and large bowels. Part 1: Some enzymatic activities of normal human and laboratory animals. Jap. Arch. Intern. Med. 16, 227-241, (1969)
28. Jerusalem, C., Eling, W. und P. Yap: Histochemische und elektronenmikroskopische Veränderungen der Leberzellen im Tagesrhythmus und unter experimentellen Bedingungen. Acta histochem. (Jena) 36, 168-206, (1970)

15. Follet, B.K.: Diurnal rhythms of monoamineoxidase activity in the quail hypothalamus during photoperiodic stimulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 29, 591-600, (1969)
16. Forsgren, E.: On the relationship between the formation of bile and glycogen in the liver of rabbits. *Scand. Arch. Physiol.* 53, 137-152, (1928)
17. Frajola, W.J.: Circadian aspects of enzym activity. *Ross Conf. Pediatr. Res.* 39, 74-75, (1961)
18. Frič, P. und Zd. Lojda: Enzymes of the human jejunal mucosa. *Acta gastro-ent. belg.* 27, 528-530, (1964)
19. Fuller, R.W. und H.D. Snoddy: Feeding schedule alteration of daily rhythm in tyrosine alpha-ketoglutarate transaminase of the liver. *Science* 159, 738, (1968)
20. Glenner, G.G., Burtner, H.J. und G.W. Jr. Brown: The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts. *J. Histochem. Cytochem.* 5, 591-600, (1957)
21. Glick, D., Fergenson, R.B., Greenberg, L.J. und F. Halberg: Circadian studies on succinic dehydrogenase pantothenate and biotin of rodent adrenal. *Amer. J. Physiol.* 200, 811-814, (1961)
22. Gomory, G.: Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 42, 23-26, (1939)

29. Jervis, H.R.: Enzymes in the mucosa of the small intestine of the rat, the guinea pig and the rabbit.
J. Histochem. Cytochem. 11, 692-699, (1963)
30. Jos, J., Frésal, I., Rey, I. und M. Lamy: Étude histochimique de la muqueuse intestinale chez l'enfant.
I. La muqueuse duodéno-jejunale normale.
Ann. Histochem. 12, 155-164, (1967)
31. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
6. Auflage, Stuttgart, (1967)
32. Klein, U.E., Drube, H.C. und H.T.H. Hansen: Untersuchungen über Muster und Verteilung von Enzymen in der Schleimhaut des menschlichen Gastrointestinaltraktes. II: Mitteilung.
Klin. Wschr. 45, 95-101, (1967)
33. Koller, S.: Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen.
4. neu bearbeitete Auflage, Darmstadt, (1969) Dr. Dietrich Steinkopf - Verlag
34. Kubat, K. und Koldovsky, O.: The oxidative enzymes in the wall of the small and large intestine of young rats during postnatal development.
Acta. histochem. Bd. 33, 75-85, (1969)
35. Leske, R.: Cycles journalis de l'assimilation et de la deassimilation du glycogène du foie. 2ème Reunion europ. d'anat. Bruxelles.
Excerpta med. Intern. Congr. series 70, 103-104, (1963)

36. Leske, R.: Geschlechts- und Saisonbeeinflüsse auf den Glykogen Tagesrhythmus.
VIII. Int. Conf. for Biol. Rhythm. Res.
Hamburg, (1963)
37. Leske, R.: Fixationsunterschiede des Lebergewebes in Abhängigkeit rhythmusbedingter Schwankungen.
VIII. Int. Anatomenkongr. Wiesbaden
155-156, (1965)
38. Levine, R. J. und A. Sjoerdsma: Direct measurement of monoamine oxidase in humans.
Clin. Pharmacol. Ther. 4, 22-27, (1963)
39. Lojda, Z., Frič, P., Jodl, J. und J. v. Chremlik: Cytochemistry of the human jejunal mucosa in the norm and in malabsorption syndrome.
Current Topics in Pathology .. ,
Berlin, Heidelberg, New York, (1970)
40. Lüthy, E. und F. Vezár: Adenosine triphosphatase and hexokinase in the epithelium of the small intestine in normal and adrenalectomized rats.
J. Biochem. 54, 316-320, (1954)
41. v. Mayersbach, H.: The cellular aspects of biorhythms.
Berlin, Heidelberg, New York, (1967)
42. v. Mayersbach, H.: Die Bedeutung normal-biologischer Faktoren für die topochemische Zell- und Gewebeforschung.
Physiol. Chem. 350, 1169-70, (1969)

- 43.v.Mayersbach,H.und R.Leske: Physiologische Schwankungen des Glykogen Tagesrhythmus.
Acta morph. Hung.12,33-42,(1963)
- 44.v.Mayersbach,H.,Philippens,K. und P.H.K.Yap: Die Einflüsse biologischer Tagesschwankungen auf ferment-histochemische Untersuchungen.
II.Int.Kongr.Histo-u.Cytochem. Frankfurt/M. 139-140,(1964)
- 45.v.Mayersbach,H.und P.Yap: Quantität und Substratspezifität der Leberesterasen.
Vers.Anat.Ges.Wien,(1964)
- 46.v.Mayersbach,H.und P.H.H.Yap: Tagesrhythmische Schwankungen der Leberesterase.
Histochemie 5,297-302,(1965)
- 47.Müller,O.,Jerusalem,Chr.und H.v.Mayersbach: Die Ultrastrukturen der physiologischen Tagesschwankungen in Leberzellen von Ratten.
z.Zellforsch.69,438-451,(1966)
- 48.Nachlas,M.M.,Tsoa,K.C.,de Soura,E.,Cheng,C.S. und A.M.Seligmann: Cytochemical demonstration of succine dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole.
J.Histochem.Cytochem.5,420-431,(1957)
- 49.Nachlas,M.M.,Crawford,D.und A.M.Seligman: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase.
J.Histochem.Cytochem.5,264-276,(1957)

50. Nachlas, M.M., Walker, D. und A.M. Seligman: A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 29-38, (1958)
51. Nakamura, M., Pichette, P., Broitman, S., Bezman, A.L., Zamcheck, N. und J.J. Vitall: Studies on the inhibitory of intestinal mucosa on succinoxidase activity.
J. Biol. Chem. 234, 206-209, (1959)
52. Noack, R., Koldovsky, O., Friedrich, M., Heringova, A., Jirsova, V. und G. Schenk: Proteolytic and peptidase activities of the jejunum and ileum of the rat during postnatal development.
Biochem. J. 100, 775-778, (1966)
53. Pearse, A.G.E. und E.O. Riecken: Histology and cytochemistry of the small intestine, in relation to absorption.
Brit. med. Bull. 23, 217-222, (1967)
54. Rassner, G., Petzoldt, D. und O. Braun-Falco: Zur quantitativen Bewertung histochemischer Dehydrogenasen.
Histochem. 5, 70-77, (1965)
55. Richter, G. und A. Pirson: Enzyme von Hydrodictyon und ihre Beeinflussung durch Beleuchtungsperiodik.
Flora 144, 562-597, (1957)

56. Rubin, B.A.: Vortrag und Diskussion: Die Situation in der biologischen Wissenschaft. 2. Beiheft z. Sowjetwissenschaft 268-275, (1948)
57. Rudolph, P. und U.E. Klein: Histochemische Darstellung und Verteilung der Glukose-6-Phosphat-dehydrogenase in normalen Rattenorganen. Histochem. 4, 238-251, (1964)
58. Shnitka, S.H.: Enzymatic histochemistry of gastrointestinal mucous membrane. Fed. Proc. 19, 897-904 (1960)
60. Spiro, H.M., Filipe, M.I., Stewart, I.S., Booth, C.C. und A. G.E. Pearse: Functional histochemistry of the small bowel mucosa in malabsorptive syndromes. Gut 5, 145-154, (1964)
61. Tuba, J.: Enzymes of the intestinal mucosa. Meth. med. Res. 9, 310-325, (1961)
62. Venter, J.: Untersuchungen über tagesperiodische Amylaseaktivitätsschwankungen. Ztschr. f. Bot. Bd. 44, 59-76, (1956)
63. Vezár, F., Sailer, E. und R. Richterich: Einfluß der Nebennierenrinde auf die alkalische Phosphatase der Dünndarmschleimhaut. Helv. physiol. Acta 10, 231-246 (1952)
64. Vollrath, L.: Über die Entwicklung des Dünndarms der Ratte. Morphologische, histochemische und experimentelle Untersuchungen. Z. Anat. Entwicklungsgesch. 41, 7-70, (1969)

65. Withrow, R.B.: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. The American Association for the Advancement of Science. Washington (1959)
66. Wohlrab, F.: Der Einfluß biologischer Faktoren auf histochemische Reaktionsausfälle im Tierexperiment. Acta Histochem. 39, 12-31, (1971)
67. Wolf, W.: Rhythmic functions in the living system. Ann. N.Y. Acad. Sci. 98, 753-1326 (1962)
68. Wurtmann, R.J.: Daily rhythmic changes in tyrosine transaminase activity of the rat liver. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 57, 1594-1598, (1968)
69. Yap, P.H.K.: Rhythmusunterschiede bei Lyo- und Desmoenzymen. VIII. Int. Anatomenkong. Wiesbaden (1965)
70. Yap, P.H.K.: Circadian phase differences of Lyo- and desmoenzymes. In: The cellular aspects of biorhythms. Hrsg. von H.v. Mayersbach, 143-146, (1967)
71. Zimmermann, H.: Diskussionsbeitrag zu: Eder, M. (1959) Histochemische Fermentnachweise. Ihre Bedeutung in der Pathologie. Verh. dtsh. Ges. Path. 42, 374-391, (1959)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.A.Schäfer für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung.

Die statistischen Untersuchungen wurden im Institut für Statistik und Dokumentation der Universität durchgeführt. Ich danke Frau Dr. Ehrenberg-Kieckebusch für ihre Beratung und Unterstützung bei der Durchführung.

LEBENS LAUF

Am 27. August 1946 wurde ich, Gerd Joachim Allbach als zweites Kind des Praktischen Arztes Dr. Julius Allbach und seiner Ehefrau Ilse geborene Westfehlung in Homberg geboren und evangelisch getauft.

Von 1953 bis 1966 besuchte ich die Schule und legte am Neusprachlich-Naturwissenschaftlichen Gymnasium in Ludwigshafen im Oktober 1966 die Reifeprüfung ab.

Vom Wintersemester 1966/67 an studierte ich Medizin an der Johannes-Gutenberg Universität in Mainz; am 1.7.1972 legte ich hier die ärztliche Prüfung ab.

Ich bin mit der medizinisch technischen Assistentin Johanna Allbach geborene Grosch verheiratet; wir haben eine Tochter Sabine Allbach.

